



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주지역 양식 넙치에서 분리된
어병세균의 tetracycline 내성유전자 분포

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

李 多 苑

2018 年 2 月

碩士學位論文

제주지역 양식 넙치에서 분리된
어병세균의 tetracycline 내성유전자 분포

濟州大學校 大學院

海洋生命科學科

李 多 苑

2018 年 2 月

제주지역 양식 넙치에서 분리한
어병세균의 tetracycline 내성유전자
분포

指導教授 鄭 竣 範

李 多 苑

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2018 年 2 月

李 多 苑의 理學碩士 學位論文을 認准함

審査委員長

허문수



委 員

員

전려진



委 員

員

정준범



濟州大學校 大學院

2018 年 2 月



Distribution of tetracycline resistance genes in
pathogenic bacteria isolated from cultured
olive flounder, *Paralichthys olivaceus* in Jeju

Da Won Lee

(Supervised by professor Joon Bum Jeong)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

Department of Marine Biomedical Science
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2018

목 차

목 차	i
Abstract	iii
LIST OF FIGURES	v
LIST OF TABLES	viii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 실험균주	4
2. 항생제 감수성 검사	6
2-1. 약제감수성 시험	6
2-2. Minimum inhibitory concentrations 측정	7
3. Polymerase Chain Reaction	8
3-1. Total nucleic acid 분리	8
3-2. PCR 및 multiplex PCR	9
III. 결 과	12
1. 실험균주 분리	12
2. 약제감수성	22
2-1. Tetracycline/oxytetracycline 내성균주의 분리	22
2-2. 약제감수성	23
2-3. Minimum inhibitory concentration	28
3. PCR	31
IV. 고 찰	38

V. 요약	46
VI. 참고 문헌	47
VII. 감사의 글	52

Abstract

Constant use of antibiotic has resulted in emergence of resistant bacteria of it, and there are several issues increasing social concerns on public health internationally; raised issues are including difficulty on infection treatment, safety issues with residue of antibiotic, and transmission of resistant bacteria to human body.

Therefore, this study determined resistant rate of fish pathogenic bacteria isolated from cultured flounder on tetracycline, typical antibiotic used in aquaculture, and analyzed the type of resistance genes distributed in resistant strain through PCR method.

In this study, we isolated and utilized 160 *Streptococcus parauberis* isolates, 1 *Streptococcus iniae* isolate, 66 *Edwardsiella tarda* isolates, 56 *Vibrio* sp. isolates, and 23 of unidentified isolates (in total 306 isolates) from presumed infected olive flounder in Jeju island from march 2016 to October 2017.

Antibiotic resistance pattern of each strains is examined on 21 different antibiotics including ampicillin, nalidixic acid, erythromycin, kanamycin, tetracycline, and sulfadiazine. The result shows that *S. parauberis* isolates are highly resistant to quinolone type, tetracycline type, and sulfadiazine. *Vibrio* sp. isolates are highly resistant to penicillin type containing ampicillin, amoxicillin. Similar to *Vibrio* sp. isolates, *E. tarda* isolates are highly resistant to various antibiotics including penicillin type.

In addition, most strains used in the test were multi-resistance that are resistant to more than 2 types of antibiotics.

Investigation on antibiotic resistance pattern and resistant bacteria through antibiotic susceptibility test of isolated strains from Jeju requires continuous study to restrain increase of resistance on antibiotic and selection of proper treatment. This study will be basis data of resistance study by strains.

Isolated strains are generally resistant to tetracycline type antibiotic. Thus, this study

analyzed resistance genes in resistant strains to tetracycline and oxytetracycline. Out of 306 isolated strains, tetracycline resistant strains are 83 *S. parauberis* isolates, 49 *E. tarda* isolates, and 15 *Vibrio* sp. isolates (in total 147 strains). We conducted PCR and multiplex PCR to check resistance determination in resistant strains. The result of multiplex PCR to detect *tet* (A-G) from gram negative bacteria shows that *tet* (D) was found in most *E. tarda* isolates. And other genes are not found in it. The presence of *tet* (B), *tet* (D), *tet* (M), *tet* (B&M) in *Vibrio* sp. was found in isolates, and we confirmed various *tet* gene were distributed in *Vibrio* sp. The result of single PCR to detect *tet* (M), *tet* (O), *tet* (S), and so on from gram positive bacteria shows that *S. parauberis* isolates contain *tet* (M), *tet* (S), and *tet* (M&S), and *tet* (S) is most dominant gene since 76 isolates contain it.

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Number of bacterial isolates from cultured fish in Jeju.	14
Fig. 2. Detection of <i>Streptococcus</i> sp. by PCR using the specific primer sets. Lane 1-10, <i>S. parauberis</i> ; Lane 11, <i>S. iniae</i> ; Lane 12-14, <i>L. garvieae</i> ; M, 100 bp DNA ladder.	15
Fig. 3. PCR products with the specific primers for identification of <i>E. tarda</i> . Lane 1-10, <i>E. tarda</i> ; M, 100 bp DNA ladder.	16
Fig. 4. PCR results with genomic DNAs of <i>Vibrio</i> isolates from Jeju island. Lane 1-4; <i>V. alginolyticus</i> ; Lane 5-8, <i>V. harveyi</i> ; Lane 9-11, <i>Vibrio</i> sp.; M, 100 bp DNA ladder.	17
Fig. 5. PCR products with the specific primer set for <i>Tenacibaculum maritimum</i> . Lane 1-15, unidentified isolates; M, 100 bp DNA ladder.	18
Fig. 6. PCR products with the specific primer set for <i>Pseudomonas anguilliseptica</i> . Lane 1-15, unidentified isolates; M, 100 bp DNA ladder.	19
Fig. 7. The sampling sites of bacteria isolates from fish farms located in Jeju in 2016.	20
Fig. 8. Location of the sampling sites in 2017.	21
Fig. 9. Antibiotic resistance pattern of <i>S. parauberis</i> isolated from cultured fish in Jeju.	25

Fig. 10. Antibiotic resistance pattern of <i>E. tarda</i> isolated from cultured fish in Jeju.	26
Fig. 11. Antibiotic resistance pattern of <i>Vibrio</i> sp. isolated from cultured fish in Jeju.	27
Fig. 12. MIC value distribution of tetracycline against <i>S. parauberis</i> , <i>E. tarda</i> , <i>Vibrio</i> sp. isolated from olive flounder.	29
Fig. 13. MIC value distribution of oxytetracycline against <i>S. parauberis</i> , <i>E. tarda</i> , <i>Vibrio</i> sp. isolated from olive flounder.	30
Fig. 14. DNA amplification of <i>tet</i> genes in tetracycline resistant isolates of <i>E. tarda</i> from cultured fish in Jeju. Lane 1-12, <i>tet</i> (D) in <i>E. tarda</i> ; Lane 13-15, <i>tet</i> (M) in <i>E.</i> <i>tarda</i> ; M, 100 bp DNA ladder.	34
Fig. 15. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR. Lane 1-5, <i>tet</i> (B) in <i>Vibrio</i> sp.; Lane 6-8, <i>tet</i> (D) in <i>Vibrio</i> sp.; Lane 9-15, <i>tet</i> (M) in <i>Vibrio</i> sp.; M, 100 bp DNA ladder.	35
Fig. 16. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by PCR of <i>tet</i> (S), <i>tet</i> (M) in <i>S. parauberis</i> . Lane 1-12, <i>tet</i> (S) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 13-15, <i>tet</i> (M) in <i>S.</i> <i>parauberis</i> ; M, 100 bp DNA ladder.	36
Fig. 17. Electrophoretic analysis for detection of <i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (O), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (32), <i>tet</i> (37), <i>tet</i> (39) in <i>S. parauberis</i> . Lane 1-3, <i>tet</i> (K) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 4-5, <i>tet</i> (L) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 6-7, <i>tet</i> (O) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 8-9, <i>tet</i> (Q) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 10-11, <i>tet</i> (32) in <i>S. parauberis</i> ; Lane 12-13, <i>tet</i> (37) in <i>S.</i>	

parauberis; Lane 14-15, *tet* (39) in *S. parauberis*; M, 100 bp DNA ladder. …… 37

LIST OF TABLES

Table 1. Primer sets used for the detection of isolates in this study	5
Table 2. Primers and expected sizes of PCR amplicons for detection of <i>tet</i> genes using multiplex PCR	10
Table 3. Primer sets and expected size of PCR product of various <i>tet</i> genes ...	11
Table 4. Detection of various <i>tet</i> genes in tetracycline resistant isolates from cultured fish in Jeju	32

I. 서 론

양식현장 내 고밀도 사육으로 인한 수질환경 악화와 스트레스 요인의 증가로 인한 어류의 면역력 약화 및 새로운 병원체의 출현 등 질병의 다양한 감염기회 증대에 따른 질병발생은 양식현장에 연중 반복적으로 나타나 경제적 손실을 야기하고 있다(Cho et al., 2007). 양식현장에서는 발생한 세균성 질병을 통제하기 위해 주로 항생물질을 투여하고 있으나 지속적인 항생제의 사용은 항생제 내성균 발생, 다제내성균의 출현, 해양 생태계 오염 등의 문제를 야기할 수 있다. 이에 최근에는 항생제 대체방안으로 천연 항균제 개발, 천연물질을 통한 어체 내 생리 활성 증가 및 백신 개발 등의 다양한 방법들이 제시되고 있으나 2015년도 양식현장에서의 항생제 판매량에 근거하여 사용량을 추정한 결과, 200톤 이상으로 여전히 항생제의 사용량과 사용빈도는 높은 수준에 있다(Mok et al., 2001; Kim et al., 2009; KAHPA, 2015).

그 중, tetracycline은 수산업에서 널리 사용되고 있는 수산용의약품 중 하나로 호기성 그람양성 및 그람음성균, *Richettsia*, *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Malaria*, *Protozoa* 등 다양한 감염증에 작용하는 광범위 항생제로 알려져 있다. Tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, chlorotetracycline 등은 구조적으로 유사하고 약리작용 및 독성이 거의 동일하여 tetracycline계 항생제로 통합하여 평가 및 관리되고 있다. Tetracycline계 항생제의 작용기전은 세균 ribosome의 30S subunit에 결합하여 acceptor 부위에 aminoacyl tRNA가 mRNA와 결합하는 것을 방해하는 방법으로 단백질 합성을 억제시켜 정균작용을 나타낸다(Roberts, 1996). 그러나 지속적인 항생제의 사용으로 1950년대 tetracycline에 대해 저항성을 지니

는 내성균이 확인된 이후부터 현재까지 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Acinetobacter lwofii*, *Staphylococcus* sp., *Vibrio* sp. 등 다양한 세균에서 내성균의 발생이 증가함에 따라 항생제의 치료효과를 기대하기 어려운 경우가 많아졌다(Gao p. et al., 2012). Tetracycline에 저항성을 가지는 내성균의 내성 기작은 3가지로 구분되며 다음과 같다.

1. 세포 내로 침투한 tetracycline을 에너지 의존성 유출(efflux)을 통해 세포 외로 배출하여 ribosome에 축적되지 않게 하는 기작(efflux pump), 2. 단백질 합성을 위해 ribosome에 결합하는 것을 돕는 보호 단백질을 생산하는 기작(ribosomal protection), 3. 대사효소를 활성화시켜 tetracycline을 불활성화시키는 기작(enzymatic activation)이다

Chopra and Roberts (2001)와 Levy et al. (1999)는 내성균주 내 tetracycline에 대해 내성을 유발하는 내성유전자 *tet* gene은 내성기작에 따라 종류를 분류하였으며, *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (E), *tet* (G) 등은 efflux pump에, *tet* (M), *tet* (O), *tet* (Q), *tet* (S) 등은 ribosomal protection 기능에, *tet* (X)는 효소적 기능에 관여한다고 보고하였다.

항생제 내성문제는 질병 치료의 어려움뿐만 아니라 항생제 잔류에 의한 안전성 문제가 대두되며 전 세계적으로 공중보건학적 문제로서 사회적 관심과 그 중요성이 커지고 있다. 또한, 최근 항생제에 대한 내성균이 축산물이나 수산물을 통해 사람으로 전달될 수 있는 우려에 따라 항생제 사용 및 세균의 항생제 내성 현황 조사는 치료용 항생제의 선택과 내성균의 증가를 막기 위한 대책수립의 기초자료로서 필요하다. 그러나 최근 국내에서 수행된 항생제 내성균 조사는 주로

축산 위주로 이루어졌으며, 양식어류에서의 내성균 조사는 *Enterococcus* sp., *Vibrio* sp. 등 특정균주에 국한되었으며, 적은 항생제의 수로 분석되었다(Kim et al., 2013; Lee et al., 2009; Kim et al., 2010; Oh et al., 2008).

특히, 양식어류 내 내성유전자 분포에 관련된 최근 조사는 이루어지지 않고 있는 실정이며, 우리나라 넙치 생산량의 대부분을 차지하고 있는 제주지역 내 항생제 내성균의 파악과 내성경향에 대한 조사 역시 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 제주지역 양식장의 넙치로부터 분리한 어병세균들의 항생제 내성경향과 tetracycline 내성균주 내 어떤 type의 내성유전자가 분포되어 있는지 PCR을 통해 확인하여 적절한 항생제의 사용과 내성균의 관리를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 균주

본 연구에 사용된 균주들은 2016년 3월부터 2017년 10월까지 제주도 내 넙치 양식장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치로부터 균을 분리하였다.

분리균은 tryptic soy agar (TSA, Difco) 또는 brain heart infusion agar (BHIA, Difco) 배지 상에서 증식되었으며, 균의 구분을 위해 선택배지인 thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) agar (Difco), Salmonella Shigella (SS) agar (MB cell), glutamate starch phenol-red agar (GSP, Difco), Blood agar (KOMED) 배지에 시료의 내부 장기를 도말하고, 27°C에서 18~24시간 배양하였다.

Vibrio sp. 균주의 구분을 위해 비브리오 선택배지인 TCBS 평판배지 상에서 초록색 또는 노란색 집락을 형성한 것으로 규정하였으며, *Edwardsiella tarda* 균은 선택배지인 SS 배지에서 검은색 집락을 형성하는 것으로 규정하였다. 또한, 균주의 세부적인 종 동정은 PCR 방법을 사용하여 확인하였다. 종 동정에 사용한 PCR primer sets는 Table 1에 나타내었다.

실험균은 보존을 위해 20% glycerol (Sigma)을 첨가한 후 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

Table 1. Primer sets used for the detection of isolates in this study

Target pathogen	Oligonucleotide sequences (5' - 3')	Product size (bp)	Reference
<i>Streptococcus iniae</i>	AAGAGACGCAGTGTCAAAAG CGTTTCTTATCTTGTTACTC	220	
<i>Streptococcus parauberis</i>	TCCAGTCTTTCGACCTTCTT CAAAGAGATGTTCCGGCTTG	107	Woo et al., 2006
<i>Lactococcus garvieae</i>	AAGCAGTCTTTTGATGCAAG ACTGTGCGCCCTTATTA ACT	307	
<i>Edwardsiella tarda</i>	CGGTAAAGTTGAGTTTACGGGTG TGTAACCGTGTTGGCGTAAG	415	Sakai et al., 2007.
<i>Vibrio</i> genus	GTCARATTGAAAARCARTTYGGTAAAGG	689	Kim et al., 2015
<i>Vibrio alginolyticus</i>	ACYTTRATRCGNGTTTCRTRCC ACGGCATTGGAAATTGCGACTG TACCCGTCTCACGAGCCCAAG	199	
<i>Vibrio anguillarum</i>	GTTTCATAGCATCAATGAGGAG GAGCAGACAATATGTTGGATG	519	Demircan et al., 2006
<i>Vibrio harveyi</i>	GTGATGAAGAAGCTTATCGCGATT CGCCTTCTTCAGTTAACGCAGGA	601	Kim et al., 2014
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AGCTTATTGGCGGTTTCTGTCCG CKCAACACCAAGAAAAGCCGTC	297	Kim et al., 2015
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	GACCTCGCGCCATTA CTCAGCAGTTTTGAAAG	438	Blanco et al., 2002
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	TGTAGCTTGCTACAGATGA AAATACCTACTCGTAGGTACG	400	Cepada et al., 2003

2. 항균제 감수성 검사

2.1. 약제감수성 시험

분리된 균주들은 tryptic soy broth (TSB, Difco)를 사용해 증균하였으며, 27°C에서 18~24시간동안 배양하였다. 배양액은 약제감수성 시험을 위해 $10^5 \sim 10^6$ 으로 희석하여 실험에 사용하였다. 배양액은 멸균한 면봉을 이용해 mueller hinton agar (MHA, Difco) 평판에 도말한 후 항생제 디스크를 평판에 고착시켰다.

실험에 사용된 항생제 디스크는 Liofilchem® 사 제품으로 amoxicillin (10 μ g, AML), amoxicillin/clavulanic acid (30 μ g, AUG), ampicillin (10 μ g, AMP), chlorampenicol (10 μ g, C), ciprofloxacin (5 μ g, CIP), doxycycline (30 μ g, DXT), enrofloxacin (5 μ g, ENR), erythromycin (15 μ g, E), gentamycin (10 μ g, CN), kanamycin (30 μ g, K), minocycline (30 μ g, MN), nalidixic acid (30 μ g, NA), neomycin (30 μ g, N), norfloxacin (10 μ g, NOR), ofloxacin (5 μ g, OFX), oxolinic acid (2 μ g, OA), oxytetracycline (30 μ g, OT), penicillin (10 μ g, P), streptomycin (10 μ g, S), sulfadiazine (300 μ g, SUZ), tetracycline (30 μ g, TE)으로 총 21종을 대상으로 실험을 실시하였다. 디스크를 고착시킨 MHA는 27°C에서 24시간 배양 후 균의 증식 억제대를 확인하였다.

2.2. Minimum inhibitory concentrations (MICs) 측정

내성균주들의 tetracycline과 oxytetracycline에 대한 내성 정도는 broth dilution method를 적용한 MIC 값으로 나타내었다. MIC 값 측정을 위하여, 각 항생제의 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 만든 후 mueller hinton broth (MHB, Difco)로 1/2 단계희석하여 최종농도가 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 준비하였다. 이후, 96 well plate에 MHB 160 μL , 단계별로 희석한 항생제 20 μL , $10^5 \sim 10^6$ 으로 희석시킨 균 배양액을 20 μL 를 넣고, positive control에는 MHB 180 μL 과 균 배양액 20 μL 를 넣었으며, negative control에는 MHB 200 μL 만 넣었다. Plate를 27°C에서 24시간 배양한 후, 균의 증식여부에 따른 액체배지의 혼탁도를 육안으로 확인하여 균이 자라지 않는 최소농도를 MIC 값으로 결정하였다.

3. Polymerase chain reaction (PCR)

3.1. Total nucleic acid 분리

PCR을 위한 template DNA는 Higene™ Genomic DNA prep kit (BIOFACT)를 사용하였다.

먼저 DNA의 추출을 위하여, 균의 TSB에 접종하고 27°C에서 18~24시간 배양한 후 배양액 1.5 ml를 1.5 ml microtube에 넣고, 10,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 pellet을 수집하였다. Cell Re-Suspension Solution 300 μ l를 넣어 pellet을 현탁시킨 후, lysozyme 2 μ l를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고, Cell Lysis Solution 300 μ l를 넣어 pellet을 현탁시키고, RNase A 1.5 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 실온에서 식힌 후 Protein Precipitation Solution 100 μ l를 넣고, 강하게 vortex하여 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 100% Isopropanol 300 μ l가 들어있는 새 microtube에 넣고 50회 inverting하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 80% ethanol로 2번 세척하고, 15분간 상온에서 건조시킨 후, DNA Hydration Solution 50 μ l를 넣고 5초간 vortex하여 DNA를 추출하였다.

분리된 DNA는 실험에 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

3.2. PCR 및 multiplex PCR

본 연구에서는 tetracycline 내성균주 내 15종류의 내성유전자에 대하여 PCR 방법을 통해 분석하였으며, 사용된 primer sets는 Table 2와 Table 3에 나타내었다. PCR 분석을 위하여, 0.2 ml microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 μ M의 각 dNTP, 10x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo) 및 template DNA를 첨가한 후 distilled water로 PCR 혼합물의 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였다.

PCR 조건은 94°C에서 3분간 pre-denaturation시킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C에서 30초 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles를 반응시켰다. 그리고 72°C에서 7분간 post-extension시켰다.

Multiplex PCR 분석을 위하여, 0.2 ml microtube에 1 μ M의 각 primer, 2.5 μ M의 각 dNTP, 10x G-Taq Buffer, 2.5 U G-Taq DNA polymerase (Gene Pro Thermal Cycler Cosmo) 및 세균의 template DNA를 첨가한 후, distilled water로 최종 volume이 20 μ l가 되도록 하였고, 이전에 보고된 각각의 tetracycline 내성유전자에 대해 특이적으로 반응하는 단일 forward primer와 6개의 reverse primers를 넣어 실시하였다. PCR 조건은 위와 동일하게 실시하였다.

증폭산물은 1x TAE buffer (40mM Tris-acetate, 1 mM EDTA)를 전기영동을 위한 완충액으로 하여, 0.5 μ g/ml ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동 후, UV 검출기에서 band의 크기를 확인하여 tetracycline 내성유전자의 종류를 확인하였다.

Table 2. Primers and expected sizes of PCR amplicons for detection of *tet* genes using multiplex PCR

Gene	Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference
<i>tet</i> (A) to	TETF	GCGCTNTATGCGTTGATGCA		
<i>tet</i> (G)				
<i>tet</i> (A)	TAR2	ACAGCCCGTCAGGAAATT	387	
<i>tet</i> (B)	TBR	TGAAAGCAAACGGCCTAA	171	Jun, 2003
<i>tet</i> (C)	TCR3	CGTGCAAGATCCGAATA	631	
<i>tet</i> (D)	TDR3	CCAGAGGTTTAAGCAGTGT	489	
<i>tet</i> (E)	TER	ATGTGTCCTGGATTCCT	246	
<i>tet</i> (G)	TGR3	ATGCCAACACCCCGGCG	803	

Table 3. Primer sets and expected size of PCR product of various *tet* genes

Gene	Primer	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference	
<i>tet</i> (K)	TKF	GTAATGGTACCTGGTAAATC	329	Kim, 2004	
	TKR	CTATTACCTATTGTCGCTAC			
<i>tet</i> (L)	TLF	GATCGATAGTAGCCATGG	480		
	TLR	CTTCTATCAACAAGTATC			
<i>tet</i> (M)	TMF	GAATCTGAACAATGGGAT	1,099	Jun, 2010	
	TMR	CTAACAATTCTGTTCCAGC			
<i>tet</i> (O)	TOF	AGACGGAGCAGTATTAG	200		
	TOR	CTGCCCAACCTTTTGCTTCAC			
<i>tet</i> (Q)	TQF	GACTCTATGGATATAGAG	835		
	TQR	CCATATCCTCTACAATCG			
<i>tet</i> (S)	TSF	CATAGACAAGCCGTTGACC	667		
	TSR	ATGTTTTTGGAACGCCAGAG			
<i>tet</i> (32)	tet32 F	GAACCAGATGCTGCTCTT	620		Claire M. Melville et al., 2001
	tet32 R	CATAGCCACGCCACATGAT			
<i>tet</i> (37)	tet37F	AGGGATATTGGTTGGAGA	390	ML Diaz-Torres et al., 2003	
	tet37R	ATCAGTCTCATATTTTCGACA			
<i>tet</i> (39)	tet39F	CTCCTTCTCTATTGTGGCTA	701	Y Agersø et al., 2006	
	tet39R	CACTAATACCTCTGGACATCA			

III. 결 과

1. 실험균주 분리

1.1. 균주 분리 및 동정

2016년 3월부터 2017년 10월까지 제주지역 넙치 양식장에서 질병에 감염된 것으로 추정되는 넙치로부터 총 306균주를 분리하여 실험에 사용하였다.

분리균은 선택배지인 TCBS, SS, GSP, Blood agar를 사용하여 구분한 후 특이적 primer sets를 사용한 세부적인 동정을 실시하였다. 그 결과, 2016년도에 *Streptococcus* sp. 94균주, *Edwardsiella tarda* 28균주, *Vibrio* sp. 21균주, 미동정 균주 20가 분리되었으며, 2017년도에는 *Streptococcus* sp. 67균주, *E. tarda* 38균주, *Vibrio* sp. 35균주, 미동정 균주 3균주가 분리되었다(Fig. 1).

PCR을 통해 연쇄구균병 원인체를 살펴본 결과, *S. parauberis*가 160균주, *S. iniae*가 1균주로 확인되었으며, *Lactococcus garvieae*는 검출되지 않았다(Fig. 2).

E. tarda 균주는 선택배지인 SS 배지 상에서 검은색 집락이 형성된 66균주를 채집하였으며, 정확한 동정을 위한 PCR 결과에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

Vibriaceae의 동정 역시 PCR을 통해 실시되었으며, 56균주의 *Vibrio* sp. 중 *V. alginolyticus*가 4균주, *V. harveyi*가 2균주로 확인되었다. 나머지 *Vibrio* sp. 50균주들은 본 연구에서 동정하지 않은 다른 종의 *Vibrio* 균주로 추정하였다(Fig. 4).

또한, 306균주 중 23균주는 본 연구에서 사용한 선택배지와 primer sets로는 확인되지 않아 미동정 균주로 분류하였다(Fig. 5, Fig. 6).

지역에 따라 시험균주들의 분포를 살펴본 결과, 2016년 163균주 중 한경, 애월, 조천, 구좌 등 제주시에 속해 있는 양식현장에서 36균주, 2017년에는 143균주 중 47균주를 분리하였고, 대정, 남원, 표선, 성산 등 서귀포시에 위치하고 있는 양식 현장에서는 2016년과 2017년 각각 127균주, 96균주가 분리되었다(Fig. 7., Fig. 8). 즉, 실험에 사용된 균주 대부분은 양식장이 밀집되어 있는 서귀포 지역 내에서 분리되었음을 확인할 수 있었다.

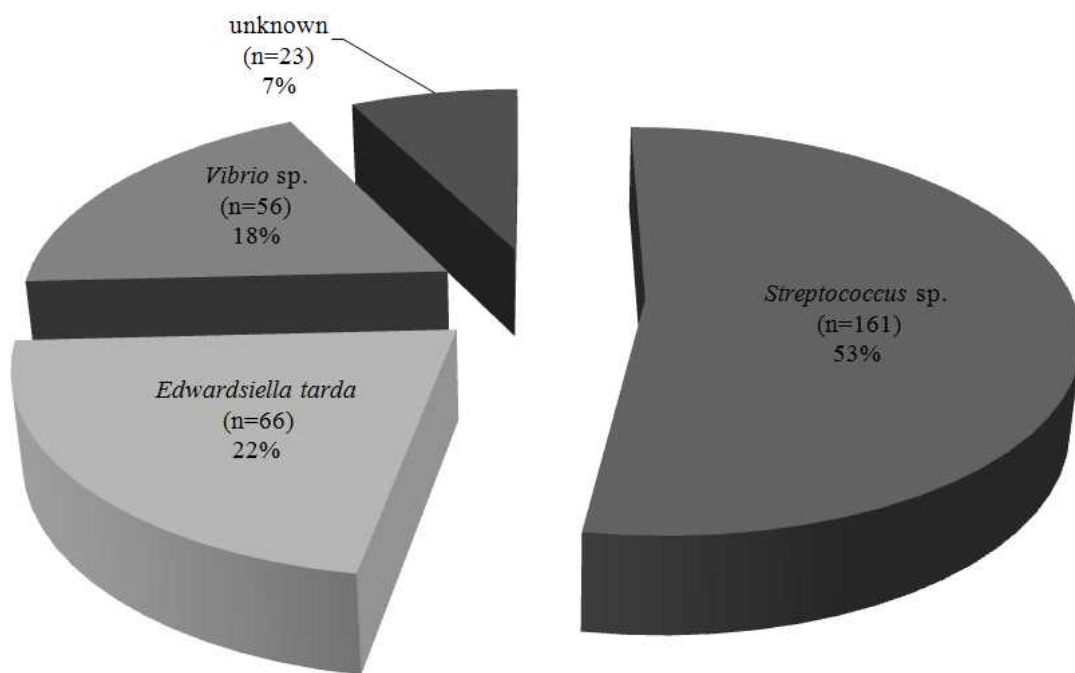


Fig. 1. Number of bacterial isolates from cultured fish in Jeju.

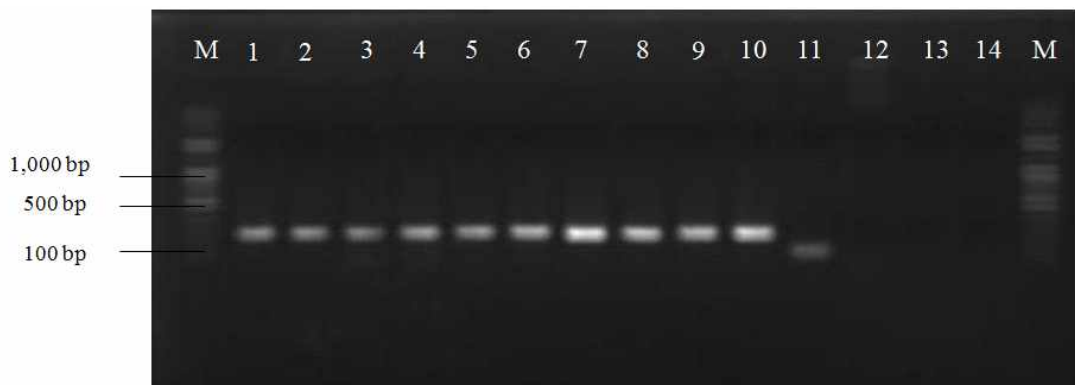


Fig. 2. Detection of *Streptococcus* sp. by PCR using the specific primer sets. Lane 1-10, *S. parauberis*; Lane 11, *S. iniae*; Lane 12-14, *L. garvieae*; M, 100 bp DNA ladder.

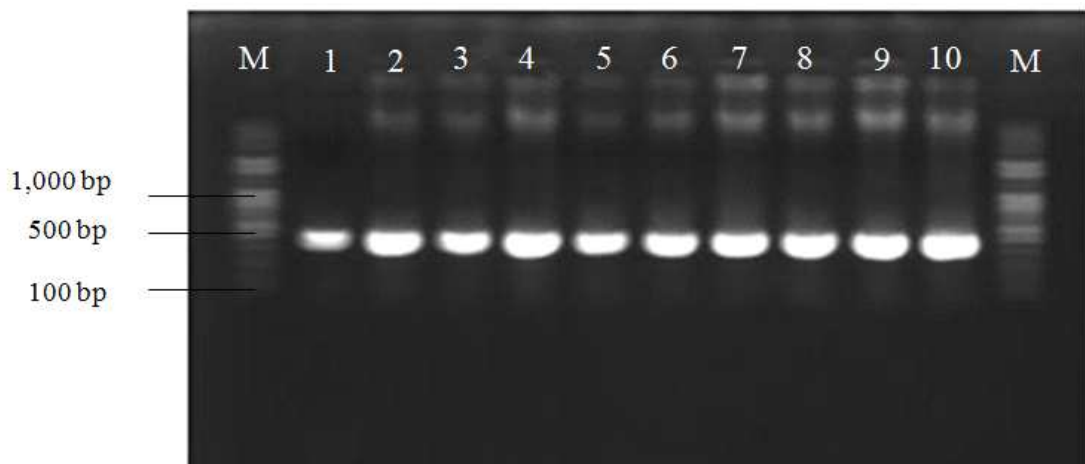


Fig. 3. PCR products with the specific primers for identification of *E. tarda*. Lane 1-10, *E. tarda*; M, 100 bp DNA ladder.

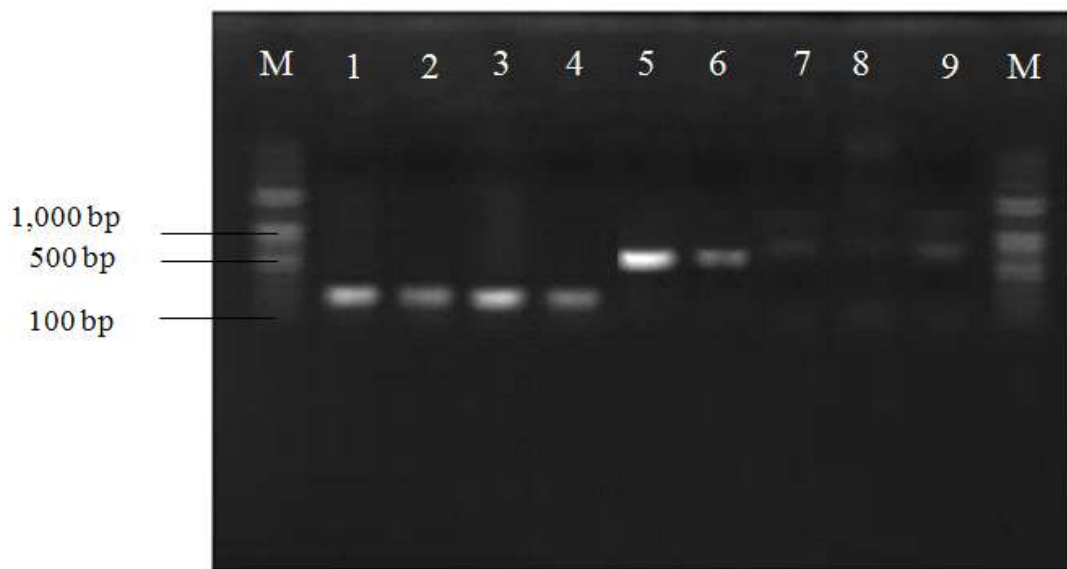


Fig. 4. PCR results with genomic DNAs of *Vibrio* isolates from Jeju island. Lane 1-4; *V. alginolyticus*; Lane 5-6, *V. harveyi*; Lane 7-9, *Vibrio* sp.; M, 100 bp DNA ladder.

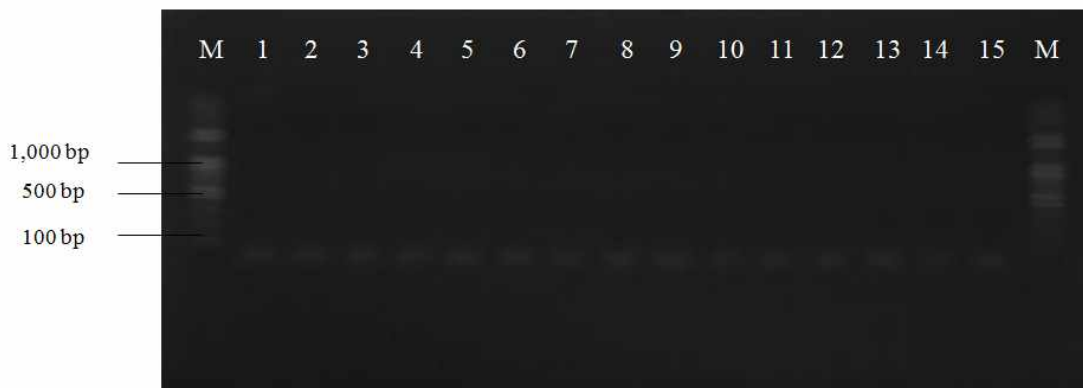


Fig. 5. PCR products with the specific primer set for *Tenacibaculum maritimum*. Lane 1-15, unidentified isolates; M, 100 bp DNA ladder.

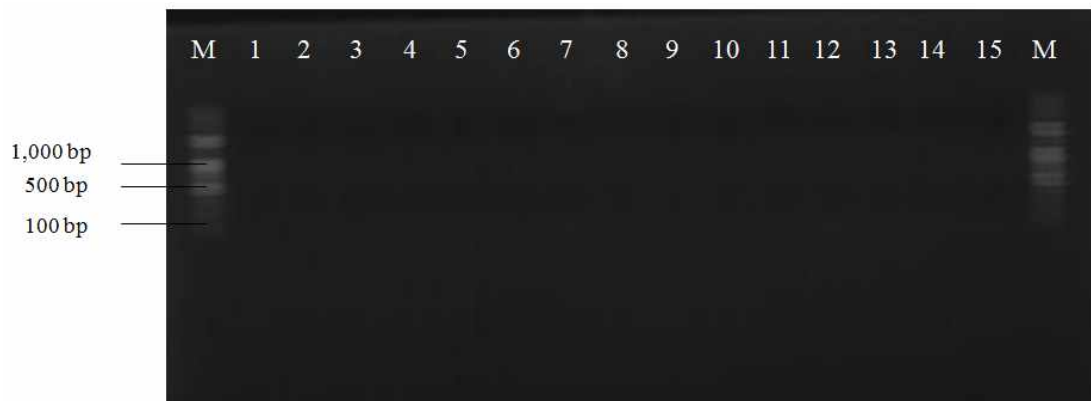


Fig. 6. PCR products with the specific primer set for *Pseudomonas anguilliseptica*. Lane 1-15, unidentified isolates; M, 100 bp DNA ladder.

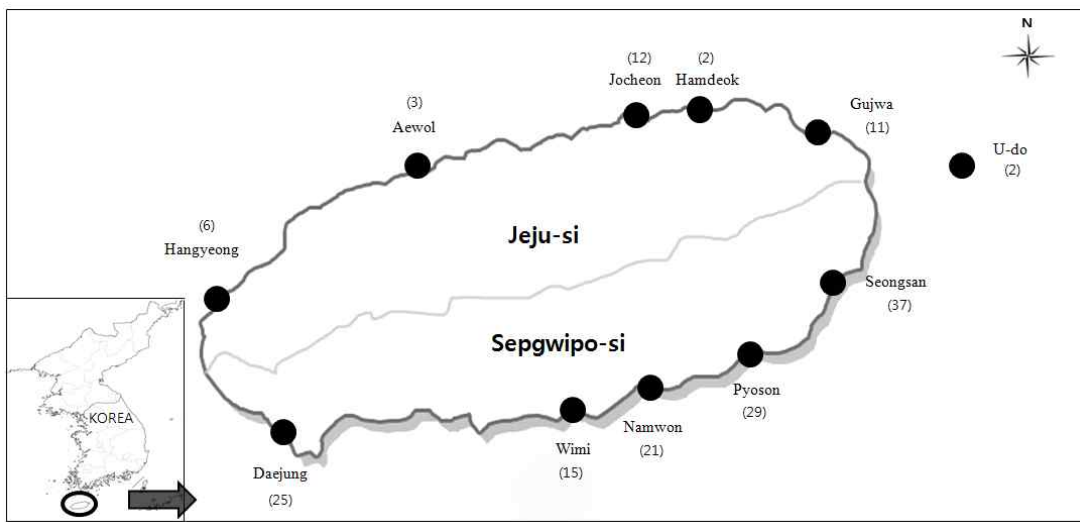


Fig. 7. The sampling sites of bacteria isolates from fish farms located in Jeju in 2016.

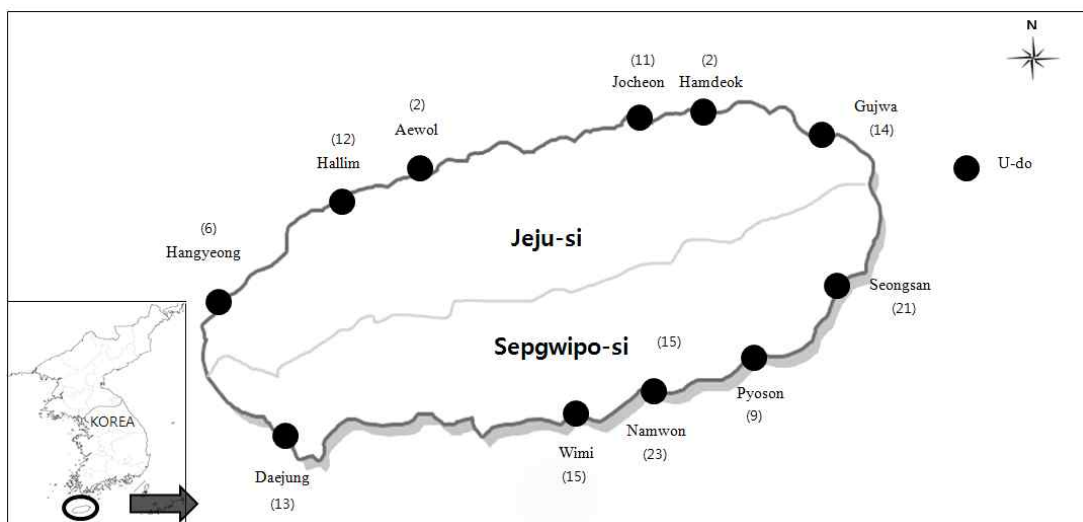


Fig. 8. Location of the sampling sites in 2017.

2. 약제감수성

2.1. Tetracycline/ oxytetracycline 내성균주의 분리

Tetracycline 내성 균주는 약제감수성 실험에서 tetracycline 및 oxytetracycline에 대해 증식억제대를 형성하지 않는 균으로 구분하였으며, 균주들의 내성 분포를 살펴본 결과, *S. parauberis* 83균주, *E. tarda* 49균주, *Vibrio* sp. 15균주가 내성균주로 확인되었다. 또한, 동정되지 않은 미동정 균주 가운데 tetracycline이나 oxytetracycline에 내성있는 균주는 7균주였다.

tetracycline 내성균주들의 제주도 내 양식지역별 분포를 살펴보았을 때, 제주시 내 한림, 애월, 조천, 구좌 등의 양식장에서 분리된 83균주 중 내성균주는 40균주였으며, 성산, 남원, 대정 등의 서귀포시에서 분리된 223균주 중 114균주로 지역에 따른 내성균의 출현에 대한 차이는 관찰되지 않았다.

또한, 조사시기별 확인을 시도한 tetracycline 내성 균주는 2016년도 163균주 중 79균주로 48%, 2017년도에는 143균주 중 75균주로 52%로 조사기간 tetracycline 내성균은 다소 증가한 것을 확인하였다.

2.2. 약제감수성

실험균주들의 항생제 내성경향을 알아보기 위한 약제감수성은 디스크 확산법을 통해 결정되었으며, 그 결과는 다음과 같다.

모든 *S. parauberis* 균주는 gentamycin에 대하여 감수성을 보였으며, nalidixic acid (90%), oxolinic acid (87%), sulfadiazine (79%), oxytetracycline (49%), streptomycin (44%), tetracycline (41%) 순으로 높은 내성률을 나타내었다. 또한, amoxicillin, doxycycline, enrofloxacin, kanamycin, minocycline, neomycin, penicillin 등의 항생제에 대해서는 10% 미만의 내성률을 나타내었다(Fig. 9).

2016년과 2017년 사이 특이적으로 내성률의 변화가 관찰된 항생제는 없었다.

분리한 56균주의 *Vibrio* sp. 균주는 대부분 amoxicillin, ampicillin, penicillin 등 penicillin계 항생제에 대해 80% 이상의 높은 내성률을 보였으며, 그 외 ciprofloxacin, enrofloxacin, oxolinic acid 등 quinolone 계열의 항생제에 대하여 감수성 있거나 대체적으로 낮은 내성률을 보였다(Fig. 10).

Vibrio sp. 균주 내 sulfadiazine에 대한 내성률은 2016년도에는 5%였으나 2017년도에는 31%로 내성률이 증가한 것을 확인하였다.

E. tarda 66균주는 다양한 계열의 항생제에 대해 높은 내성률을 보였는데 penicillin (76%), oxytetracycline (74%), tetracycline (73%), doxycycline (65%), amoxicillin (64%), ampicillin (59%), erythromycin (59%), nalidixic acid (55%), minocycline (52%), sulfadiazine (45%), streptomycin (23%) 순서로 높게 나타났다. Chloramphenicol, oxolinic acid 등의 항생제에 대하여 10% 미만의 낮은 내성률을 보였다. 또한, 모든 *E. tarda* 균주는 ciprofloxacin, gentamycin, enrofloxacin,

kanamycin, neomycin, norfloxacin에 대해 감수성을 나타내었다(Fig. 11).

실험에 사용된 306균주 중 262균주가 2종류 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성균이었으며, *S. parauberis* 152균주, *E. tarda* 62균주, *Vibrio* sp. 48균주였다. 2016년 및 2017년에 다제내성균의 비율은 *S. parauberis* 균주가 각각 95%, 96%, *E. tarda* 균주 96%, 92%, 그리고 *Vibrio* sp.에서는 각각 86%로 분리균주 내 다제내성균의 발생의 차이는 확인되지 않아 조사기간동안 뚜렷한 다제내성균의 증가 및 감소는 관찰되지 않았다.

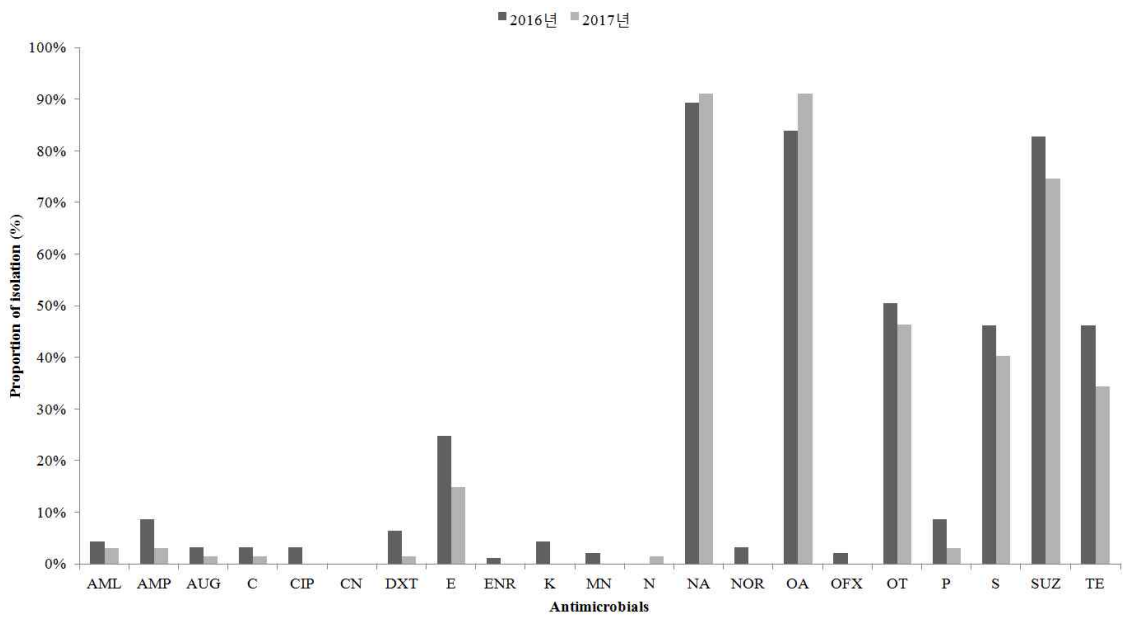


Fig. 9. Antibiotic resistance pattern of *S. parauberis* isolated from cultured fish in Jeju.

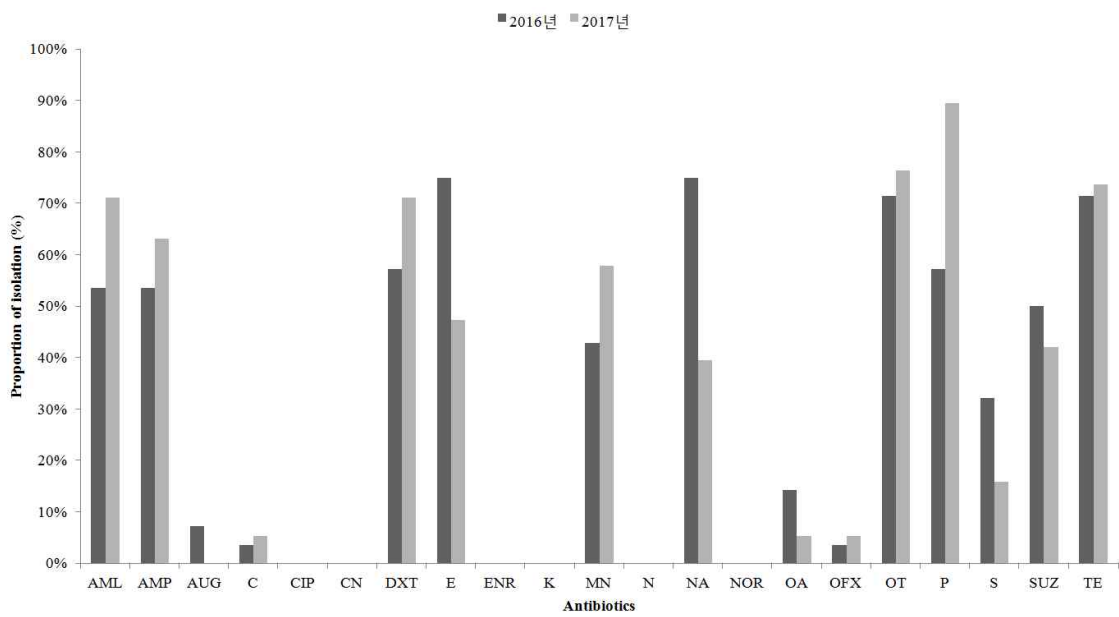


Fig. 10. Antibiotic resistance pattern of *E. tarda* isolated from cultured fish in Jeju.

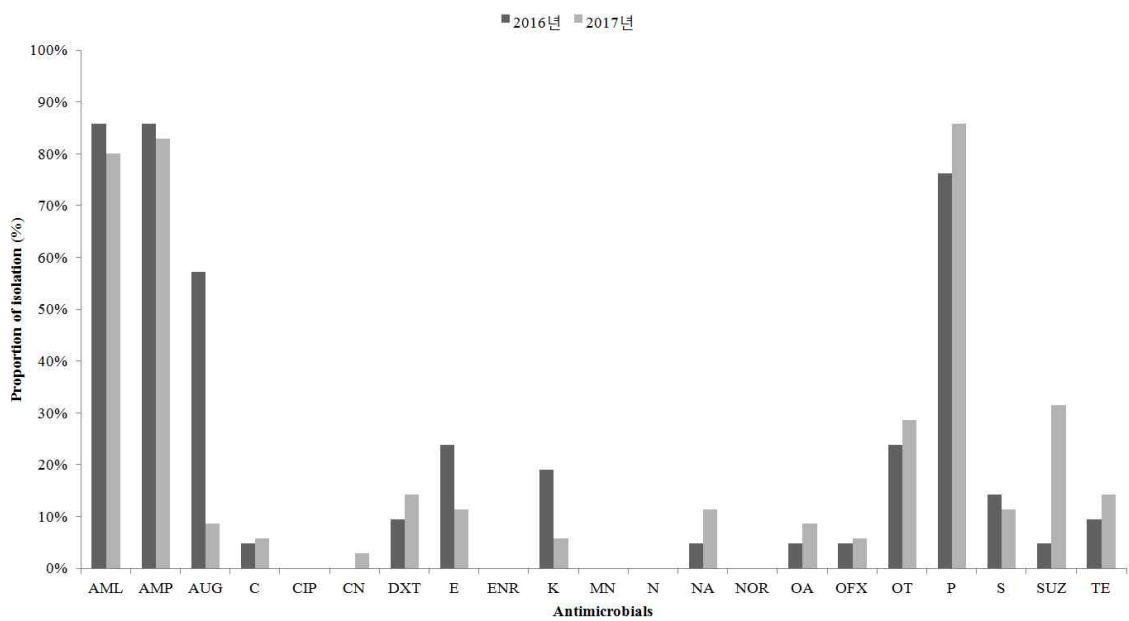


Fig. 11. Antibiotic resistance pattern of *Vibrio* sp. isolated from cultured fish in Jeju.

2.3. Minimum inhibitory concentration

약제감수성 검사를 통해 확인된 154균주의 tetracycline 및 oxytetracycline 내성 균주들의 내성수준은 MIC 값으로 확인하였다.

S. parauberis 83균주 중 4균주가 tetracycline에 대해 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상, 55균주가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 23균주는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 그리고 1균주가 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 MIC 값을 나타내었으며, oxytetracycline에 대해서는 7균주가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상, 49균주가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 23균주가 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4균주가 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 MIC 값으로 나타내었다(Fig. 12., Fig. 13). 두 항생제에 대한 *S. parauberis* 균주의 MIC값은 대부분 25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위에 속하였다.

E. tarda 49균주는 tetracycline과 oxytetracycline에 대해 각각 45균주, 46균주로 대부분의 균주들이 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 높은 내성수준을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

Vibrio sp. 균주는 대부분 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MIC 값을 나타내어 *E. tarda* 균주보다 넓은 범위의 내성수준을 나타내었으며, 7균주가 tetracycline에 대해 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 3균주였으며, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 값은 각각 4균주, 1균주였다. Oxytetracycline에 대한 값은 10균주가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 3균주였으며, 2균주는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 확인되었다.

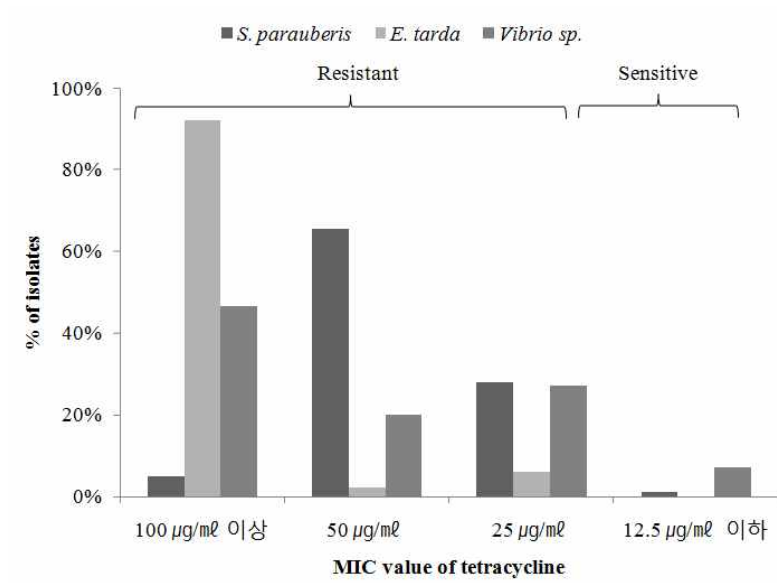


Fig. 12. MIC value distribution of tetracycline against *S. parauberis*, *E. tarda*, *Vibrio sp.* isolated from olive flounder.

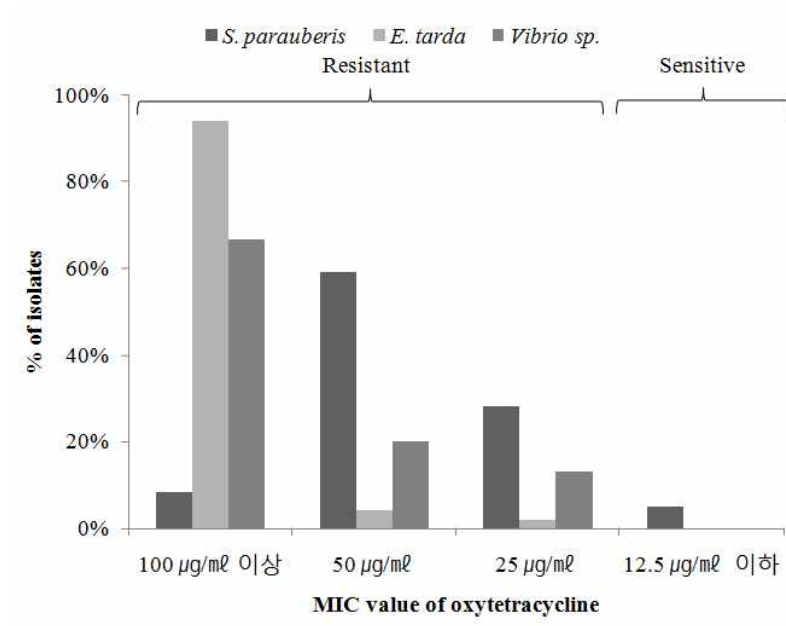


Fig. 13. MIC value distribution of oxytetracycline against *S. parauberis*, *E. tarda*, *Vibrio sp.* isolated from olive flounder.

3. PCR

Tetracycline 및 oxytetracycline에 대해 내성을 가지는 내성 균주들로부터 total nucleic acid를 분리한 후, PCR 및 multiplex PCR을 통해 tetracycline 내성유전자의 유무와 그 종류를 확인하였다.

Tet (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (E) 및 *tet* (G)의 검출을 위해 이전 Jun (2003)이 제작한 primer sets를 사용한 multiplex PCR 결과, *E. tarda* 49균주 중 45균주에서 500bp에 근접한 band를 확인할 수 있었다(Fig. 14). 즉, *E. tarda* 균주 내에는 6종류의 *tet* gene 중 *tet* (D)가 많이 존재하였으며, *tet* (D)를 제외한 나머지 유전자 *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (E), *tet* (G)는 검출되지 않았다.

Vibrio sp. 15균주에서는 *tet* (B) 1균주, *tet* (D) 3균주, *tet* (M) 1균주 및 *tet* (B&M) 같이 2종류의 내성유전자를 가지는 균주는 10균주로 확인되어 *Vibrio* sp. 균주 내에서도 다양한 *tet* gene이 분포하고 있음을 확인하였다 (Table 4, Fig. 15).

또한, multiplex PCR을 통해 확인된 각각의 *tet* gene은 multiplex PCR 뿐만 아니라 conventional PCR을 실시하였을 때에도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

그람 양성균 내 *tet* (K), *tet* (L), *tet* (O), *tet* (Q), *tet* (M), *tet* (S), *tet* (32), *tet* (37), *tet* (39)의 검출을 위한 single PCR 결과, *S. parauberis* 균주에서는 *tet* (S), *tet* (M)이 검출되었으며(Fig. 16), *tet* (M)이 1균주, *tet* (S)가 76균주로 대부분의 균주가 *tet* (S)를 지니는 것으로 확인되었다(Table 4). 또한, *tet* (M&S)같이 2종류의 *tet* gene을 가지는 균주는 2균주였다.

S. parauberis 내성균으로 분류된 균주 중 *tet* gene이 확인되지 않은 5균주를 대

상으로 *tet* (K), *tet* (L), *tet* (O) 등 다양한 *tet* gene의 검출을 시도하였으나, 어떤 *tet* gene도 검출되지 않았다(Fig. 17).

Table 4. Detection of various *tet* genes in tetracycline resistant isolates from cultured fish in Jeju

Isolates	No. of isolates	<i>tet</i> genes
<i>S. parauberis</i> (n=83)	1	<i>tet</i> (M)
	76	<i>tet</i> (S)
	2	<i>tet</i> (M&S)
<i>E. tarda</i> (n=49)	45	<i>tet</i> (D)
<i>Vibrio</i> sp. (n=15)	1	<i>tet</i> (B)
	3	<i>tet</i> (D)
	1	<i>tet</i> (M)
	10	<i>tet</i> (B&M)
total	139	

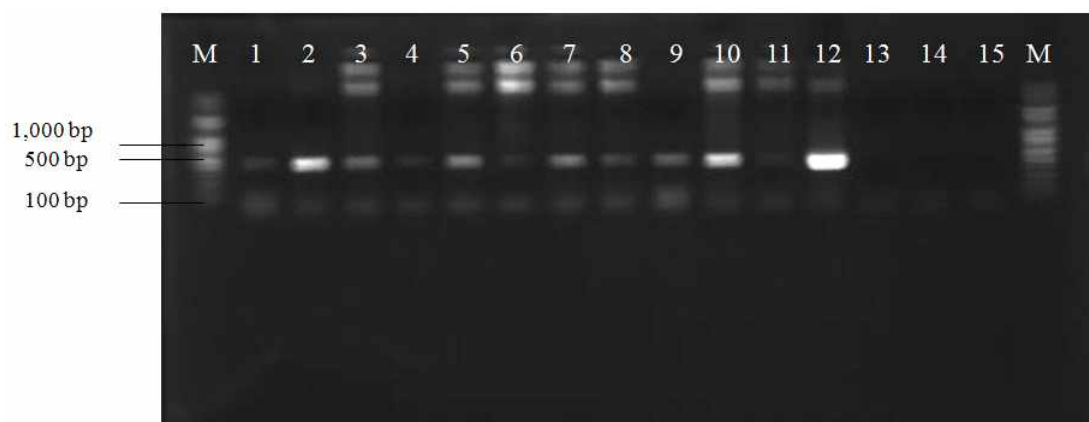


Fig. 14. DNA amplification of *tet* genes in tetracycline resistant isolates of *E. tarda* from cultured fish in Jeju. Lane 1-12, *tet* (D) in *E. tarda*; Lane 13-15, *tet* (M) in *E. tarda*; M, 100 bp DNA ladder.



Fig. 15. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by the multiplex PCR. Lane 1-5, *tet* (B) in *Vibrio* sp.; Lane 6-8, *tet* (D) in *Vibrio* sp.; Lane 9-15, *tet* (M) in *Vibrio* sp.; M, 100 bp DNA ladder.

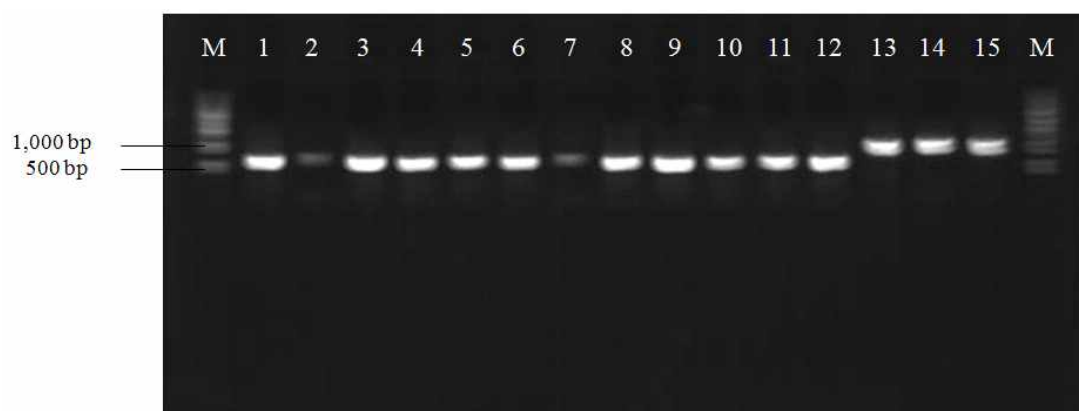


Fig. 16. Agarose gel electrophoresis of amplicons generated by PCR of *tet* (M), *tet* (S) in *S. parvauberis*. Lane 1-12, *tet* (S) in *S. parvauberis*; Lane 13-15, *tet* (M) in *S. parvauberis*; M, 100 bp DNA ladder.



Fig. 17. Electrophoretic analysis for detection of *tet* (K), *tet* (L), *tet* (O), *tet* (Q), *tet* (32), *tet* (37), *tet* (39) in *S. parauberis*. Lane 1-3, *tet* (K) in *S. parauberis*; Lane 4-5, *tet* (L) in *S. parauberis*; Lane 6-7, *tet* (O) in *S. parauberis*; Lane 8-9, *tet* (Q) in *S. parauberis*; Lane 10-11, *tet* (32) in *S. parauberis*; Lane 12-13, *tet* (37) in *S. parauberis*; Lane 14-15, *tet* (39) in *S. parauberis*; M, 100 bp DNA ladder.

IV. 고 찰

에드워드병, 연쇄구균병, 비브리오병, 활주세균병 등은 양식현장에 매년 반복적으로 출현하여 피해를 유발하는 세균성 질병으로 알려져 있으며, 양식현장에서는 생산량 증대를 위한 고밀도 양식에 따른 사육환경의 악화 등 다양한 질병감염기회 증대 및 확산으로 인해 발생한 세균성질병의 제어를 위해 항생제를 지속적으로 사용하고 있다. 그러나 항생제의 오·남용으로 인한 항생제 내성균의 출현은 수산물의 감염증 치료에 문제를 야기할 뿐만 아니라 환경이나 식품을 통해 사람에게 전이되어 문제를 일으킬 가능성이 보고되고 있다. 이에 최근 세계보건기구(WHO), 동물보건기구(OIE), G20 정상회의, 글로벌보건안보구상(GHSA) 등에서는 항생제 내성문제의 심각성을 지적하고 국가차원의 대응을 촉구하고 있으며 무엇보다도 항생제 내성 문제 인식을 위해 국가 감시체계 구축 및 운영을 강조하고 있다. 그러나 국내 양식업에서 약제감수성을 통한 내성균의 확인 및 균주들의 내성경향에 관한 연구는 특정 균주를 대상으로 실시하였거나 사용된 항생제의 수가 제한적이었다(Kim et al., 2010; Son et al., 2005). 또한, 더 나아가 내성균주 내 그에 따른 내성유전자에 대한 최근의 조사는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 제주지역 내 양식업으로부터 분리한 어병세균들의 다양한 항생제 내성경향과 tetracycline 내성균의 비율을 조사하고 내성균 내 어떤 type의 내성유전자가 분포하고 있는지를 PCR을 통해 분석하고자 하였다.

2016년부터 2017년까지 제주도 내 넙치양식장에서 *S. parauberis* 160균주, *S. iniae* 1균주, *E. tarda* 66균주, *Vibrio* sp. 56균주와 미동정 균주 23균주를 분리하

여 총 306균주를 실험에 사용하였다.

이전 연쇄구균병은 *Lactococcus garvieae*, *S. parauberis*, *S. iniae*, *Enterococcus* sp. 등에 의해 발생된다 보고되었으나, 본 연구에서 분리한 연쇄구균의 세부적인 동정 결과, *S. parauberis* 균주가 160균주로 *Lactococcus garvieae*나 *S. iniae*보다 *S. parauberis*의 검출빈도가 뚜렷하게 증가하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Lee et al., 1994; Lee et al., 2001; Oh et al., 1998). 이전 제주도 내 연쇄구균병 원인체의 동정 결과, *S. iniae*와 *S. parauberis*의 검출률이 각각 46%, 54%로 비슷하였다는 보고(Jeong et al., 2006)와 검출률에서 차이를 보였는데 이는 이전 *S. iniae* 균주에 대한 안정적인 백신이 개발됨에 따라 발병률이 낮아짐으로 현재 *S. parauberis* 균주에 의한 연쇄구균병이 다발하고 있는 것으로 보여진다.

또한, Thompson et al. (2004)은 65종이 넘는 다양한 비브리오 세균에 의해 비브리오병이 발생되며, 계속해서 새로운 종이 발견되는 추세라 보고하였으며, 본 연구에서는 선택배지인 TCBS 배지 상에서 노란색 또는 초록색 colony를 형성하는 것으로 분류한 후, 이전 Kim et al. (2014), Kim et al. (2015)의 방법을 참고하여 56균주의 *Vibrio* sp.의 세부적 동정을 실시하였다. 그 결과, *V. alginolyticus*가 4균주, *V. harveyi*가 2균주로 확인되었다. 이전 제주도 내 *Vibrio* sp. 균주들의 동정을 실시한 결과를 살펴보면, *Vibrio scophthalmi*, *V. harveyi*, *V. anguillarum*, *V. fischeri*, *V. pelagius*, *V. pomeroyi*, *Photobacterium damsela* 등이 검출되어 본 연구에서 동정을 실시하지 않았던 다양한 종류의 비브리오 균주들이 제주도 내에 분포하고 있음을 확인할 수 있었다(Jo, 2007).

분리된 균주들의 ampicillin, ciprofloxacin, enrofloxacin, nalidixic acid, oxolinic

acid, chloramphenicol, tetracycline, erythromycin, kanamycin, penicillin 등을 포함한 21종의 항생제에 대한 약제감수성 결과, *S. parauberis* 균주는 quinolone계 항생제인 nalidixic acid, oxolinic acid와 tetracycline계 항생제인 tetracycline, oxytetracycline 그리고 sulfadiazine에 대해 각각 88%, 44%, 79%로 높은 내성률을 나타내었다. 반면에 ampicillin, penicillin 등의 항생제에 대해서는 약 90%의 감수성을 보였다. 다음 결과는 nalidixic acid, oxolinic acid에 대해 각각 64.8%, 58.1%의 내성률이 확인되었다는 이전의 보고보다 증가한 내성률이 확인되었으며, amoxicillin, ampicillin 등 penicillin계 항생제에 대해 낮은 내성률에 대하여 이전의 보고들과 일치하는 결과를 확인할 수 있었다(Yang, 2008; Jeong, 2006).

56균주의 분리된 *Vibrio* sp. 균주들은 ampicillin, amoxicillin 등의 penicillin계 항생제에 대해 83%로 높은 내성을 보여 이전 Son et al. (2005)과 Kim et al. (2010)이 다양한 *Vibrio* sp. 균주 내에서 ampicillin에 대해 90%가 넘는 높은 내성률을 보였다는 보고의 결과와도 유사하였다. 또한, *Vibrio* 균주는 penicillin계 외 다른 계열의 항생제에 대해서는 대체적으로 10% 이하로 낮은 내성률을 보였는데, 이는 다양한 항생제에 대해 *Vibrio* sp. 균주 내 약제감수성 결과에서 감수성있거나 매우 낮은 내성률을 보인 이전의 결과와 동일하였다(Lee et al., 2009).

한편, *Vibrio* sp. 균주 내 tetracycline계 항생제에 대한 내성 정도는 종마다 차이가 있는 것으로 확인되어 이후 세부적 종 동정과 함께 조사가 더 필요할 것으로 여겨진다.

E. tarda 균주는 *Vibrio* sp. 균주와 유사하게 penicillin계 항생제를 포함한 tetracycline, erythromycin, sulfadiazine 등 다양한 계열의 항생제에 높은 내성률

을 나타내었으며, 특히, penicillin계열과 doxycycline, minocycline같은 2세대 tetracycline계 항생제에 대해 2016년도 대비 2017년에 내성균의 비율이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

또한, 실험에 사용된 모든 균주들은 norfloxacin, chloramphenicol 등의 항생제에 대해 감수성 있거나 매우 낮은 내성률을 보였다. 이는 다음 항생제들이 안전성 및 유효성에 문제가 발생해 동물에 투여되는 것이 금지되면서 항생제의 사용량이 감소하며 균주들의 내성빈도 역시 낮아진 것으로 판단되며, 이는 이전 덴마크, 캐나다 등 다른 나라에서 항생제의 사용량을 줄였을 때 항생제 내성률 또한 감소하였다는 결과와도 일치하였다. 이로 볼 때, 실험균주들이 대부분의 항생제에 대해 내성균의 비율이 비슷하거나 증가하는 양상을 보이는 것은 양식현장에서 항생제의 투여량이 줄어들지 않고 여전히 지속적으로 사용되어지고 있다고 추정할 수 있었다.

실험에 사용된 306균주 중 263균주가 2종류 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성균이었으며, 이전 *S. parauberis* 균주와 *E. tarda* 균주에서 다제내성균을 확인하였던 연구들은 다제내성균의 비율이 90% 이상이었다고 보고하였으며, 본 연구에서도 각각 95%, 93%로 그와 유사한 결과를 확인할 수 있었다. Kim et al., (2010)은 *Vibrio* sp. 균주 내 다제내성균의 비율이 58%라 보고하였으나, 본 연구에서는 88%로 다제내성균의 비율이 증가한 것을 확인하였다.

제주지역 내 약제감수성을 통한 균주들의 항생제 내성균주 파악과 항생제 내성경향 조사는 어류의 병원성 세균 내 항생제에 대한 내성 증가 억제 및 적절한 치료약제의 선택을 위해 지속적인 연구가 필요하며, 본 연구가 균주 별 내성경향

파악에 대한 기초자료로 활용될 것으로 사료된다.

양식 넙치 내 주요 세균성 질병인 연쇄구균병, 비브리오병, 에드워드병의 원인체들의 항생제 내성경향을 살펴본 결과, 3균주들에 대해 공통적으로 높은 내성률이 관찰된 항생제는 tetracycline계 항생제로 확인되었다. 본 연구에서는 그에 따라 tetracycline 및 oxytetracycline 내성균주 내 내성유전자에 대해 분석을 실시하였다.

제주도 내 양식장에서 분리한 306균주 중 tetracycline 내성균주는 *S. parauberis* 83균주, *E. tarda* 49균주, *Vibrio* sp. 15균주를 분리해 총 147균주를 내성균주로 구분하였다. 다음 내성균주들은 MIC test를 통해 내성수준을 살펴본 후, 균주들이 지니고 있는 내성유전자의 종류 및 분포를 PCR과 multiplex PCR을 통해 확인하였다.

Chopra and Roberts (2001)는 대부분 그람음성세균에서 *tet* (A), *tet* (B), *tet* (C), *tet* (D), *tet* (E) 및 *tet* (G) 6종류의 *tet* gene이 나타난다고 보고하였으며, Jun (2003)은 다음 각 *tet* gene의 검출을 위해 제작한 specific primers를 사용하여 그람음성세균 내 내성유전자의 분포를 살펴보았다. 이에 본 연구에서도 특이적 primer sets를 사용한 multiplex PCR을 통해 제주지역 양식넙치에서 분리한 그람음성세균에서 tetracycline 내성유전자를 살펴보았다. 그 결과, *E. tarda* 49균주 내에서 45균주가 *tet* (D)를 지니고 있는 것을 확인하였으며, 이전 *E. tarda* 균주에서 *tet* (A)와 *tet* (D)가 발견된다고 보고한 Roberts (1996)의 결과와 유사하였다.

Tet (M)은 그람양성세균과 음성세균뿐만 아니라 mycoplasma에서도 발견된다고 Chopra and Roberts (2001), Roberts (2005)는 보고하였으며 이에 *tet* (D)가 검출

되지 않은 *E. tarda* 4균주에 대해 *tet* (M)의 검출을 위한 single PCR을 실시하였으나 *tet* (M)은 확인되지 않았다. *tet* (D)가 검출된 *E. tarda* 45균주들의 MIC 값을 살펴보면 모두 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 높은 MIC 값을 지녔으나, tetracycline 및 oxytetracycline에 대해 각각 25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 MIC 값을 지닌 균주에서는 *tet* gene이 확인되지 않았다. 이는 *E. tarda* 균주 내 tetracycline에 대한 MIC 값이 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이었을 때 *tet* gene이 확인되었다는 보고와 비교하였을 때, 본 연구에서 분리한 *E. tarda* 균주 내에 다른 종류의 *tet* gene이 분포할 가능성이 있는 것으로 추정하였다.

Vibrio sp. 균주에서 확인된 내성 유전자는 각각 *tet* (B), *tet* (D), *tet* (M), *tet* (B&M)이었다. Jun (2003)과 Kim (2004)은 이전 *Vibrio* sp. 균주 내에서 *tet* (B)와 *tet* (B&M)의 분포가 확인되었다고 보고하였으며, 그와 동일하게 본 연구에서의 *tet* (B)와 *tet* (B&M)의 분포는 이전의 결과들과 일치하였으나, *tet* (D)의 검출은 이전에 확인된 것과 상이한 *tet* gene의 분포를 확인할 수 있었다. 또한, *Vibrio* sp. 내 *tet* gene을 지니는 균주들의 tetracycline과 oxytetracycline에 대한 내성 정도를 확인한 결과, *tet* (B), *tet* (D), *tet* (M) 같이 1종류의 *tet* gene을 지니는 균주에서는 12.5~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였으며, 2종류의 *tet* gene을 지니는 균주에서의 MIC 값은 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 2종류의 *tet* gene을 지니는 균주에서의 MIC 값이 더 높은 것을 확인하였다.

Tet (K), *tet* (L), *tet* (M), *tet* (O), *tet* (S) 등은 그람양성세균에서 주로 존재한다고 알려져 있으며, *S. parauberis* 균주 내 *tet* gene의 검출을 위한 PCR 결과, 83균주 내 tetracycline 내성균주에서 *tet* (S)가 76균주였으며, *tet* (M)과 *tet* (M&S)는 각

각 1균주, 2균주로 확인되었다.

이전 제주지역 내 *S. parauberis* 균주의 *tet* gene을 확인한 연구에서는 *tet* (S)보다 *tet* (M)의 검출률이 더 높은 것을 확인하였으나 본 연구에서는 *S. parauberis* 균주 내에서 *tet* (S)가 가장 dominant한 gene으로 확인되어 이전의 결과와 다소 차이가 있었다(Park et al., 2009).

미동정 균주에 대한 내성유전자 조사는 균주 별로 지니고 있는 내성유전자를 규정하기 어려움이 있어 추후에 균주들의 세부적인 동정을 실시한 후 이루어져야 할 것으로 사료된다.

약제감수성 검사 결과에서 tetracycline 및 oxytetracycline에 대해 내성을 보였으나 PCR을 통해 *tet* gene이 확인되지 않은 *S. parauberis* 5균주, *E. tarda* 4균주는 본 연구에서 사용한 primer sets로는 내성유전자를 확인할 수 없었다. 다음 9균주에 대해서는 본 연구에서 확인을 시도하지 않은 다른 종류의 *tet* gene이거나, 새로운 종류의 내성유전자 출현 등의 결과로 해석할 수 있었다.

본 연구에서 tetracycline계 항생제는 양식넙치에서 분리한 어병세균 내에서 높은 내성비율이 확인되었으며, tetracycline에 내성을 유발하는 내성결정인자인 tetracycline 내성유전자는 세균의 종에 따라 다양한 *tet* gene이 존재한다고 보고되어 있다.

국내 양식현장에서는 외국에 비해 비교적 자유롭게 항생제를 투여하고 있기 때문에 국내 양식어류에서 분리한 어병세균 내에서 기존에 존재한다고 밝혀진 유전자 이외의 새로운 항생제 내성결정인자가 발생할 가능성이 높으며, 이를 방지하기 위한 지속적인 연구가 필요하다. 따라서 추후에는 본 연구에서 실시한 *S.*

paruberis, *Vibrio* sp., *E. tarda* 균주 이외의 다양한 세균들을 대상으로 항생제 사용 및 내성 모니터링이 실시되어야 할 것으로 사료된다.

V . 요 약

양식현장에서는 세균성 질병의 제어를 위해 항생제를 지속적으로 사용하고 있다. 그러나 항생제의 오랜 사용으로 인해 항생제 내성균의 출현이라는 필연적인 결과 발생하였으며, 항생제 내성문제는 내성균으로 인한 감염증 치료의 어려움, 약물의 유실로 인한 환경오염 및 사람으로 내성이 전이될 가능성 등의 문제가 제기되고 있다. 이에 본 연구에서는 우리나라 넙치 생산량의 절반 이상을 차지하고 있는 제주지역 양식넙치로부터 분리한 어병세균 내 다양한 항생제의 내성경향과 tetracycline 내성균주의 비율을 조사하고 내성균 내 어떤 type의 내성유전자가 분포하고 있는지를 PCR을 통해 분석하고자 하였다.

제주지역에서 분리한 *S. parauberis*, *E. tarda*, *Vibrio* sp. 균주 내 tetracycline 내성균의 비율은 각각 52%, 68%, 27%임을 확인할 수 있었다. 또한, 분리한 내성균주 내 어떤 종류의 *tet* gene이 분포하고 있는지를 PCR 및 multiplex PCR을 통해 분석한 결과, *S. parauberis* 83균주 내에는 *tet* M, *tet* S, *tet* M+S가 확인되었으며, *tet* S가 76균주로 가장 흔하게 분포하고 있는 것을 확인할 수 있었다.

E. tarda 49균주 중 45균주에서 *tet* A, *tet* B, *tet* C, *tet* D, *tet* E, *tet* G 중 *tet* D가 확인되었다. 또한, *S. parauberis* 5균주, *E. tarda* 4균주에서는 본 연구에서 사용한 primer sets로 확인할 수 없어 본 연구에서 검출을 시도하지 않은 다른 종류의 *tet* gene일 것이라 추정하였다.

Vibrio sp. 균주에서 확인된 내성 유전자는 각각 *tet* B, *tet* D, *tet* M, *tet* B+M이었다. *Vibrio* sp. 균주 내 *tet* D의 검출은 이전에 확인된 *tet* gene과 상이한 분포를 확인할 수 있었다.

VI. 참고 문헌

Blanco, M.M., Gibello, A., Vela, A.I., Moreno, M.A., Dominguez, L., Fernandez-Garayzabal, J.F.: PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50: 19-27, 2002.

Cepeda, C., Garcia-Marquez, S., Santos, Y.: Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases*, 26(2): 65-70, 2003.

Cho, M.Y., Kim, M.S., Kwon, M.G., Jee, B.Y., Choi, H.S., Choi, D.L., Park, G.H., Lee, C.H., Kim, J.D., Lee, J.S., Oh, Y.K., Lee, D.C., Park, S.H., Park, M.A.: Epidemiological study of bacterial diseases of cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* from 2005 to 2006 in Korea. *J. Fish Pathol.*, 20(1): 61-70, 2007.

Chopra, I. and Roberts, M. C.: Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 65(2): 232-260, 2001.

Claire M.M., Karen P.S., Derry K.M., Harry J.F.: Novel tetracycline resistance gene, *tet(32)*, in the Clostridium related colonic anaerobe K10 and its transmission in vitro to the rumen anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 45(11): 3246-3249, 2001.

Demircan D., Candan, A.: Identification of *Vibrio anguillarum* by PCR (*rpoN* Gene) associated with Vibriosis in marine fish in Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30: 305-310, 2006.

Diza-Torres, M.L., McNab, R., Spratt, D.A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M., Mullany, P.: Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 47(4): 1430-1432, 2003.

Gao, P., Mao, D., Luo, Y., Wang, L., Xu, B., Xu, L.: Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment. *ELSEVIER.*, 46: 2355-2364, 2012.

Jeong, Y.U., Kang, C.Y., Kim, M.J., Heo, M.S., Oh, D.C., Kang, B.J.: Characterization of Streptococcosis occurrence and molecular identification of the pathogens of cultured flounder in Jeju island. *J. Microbiology.*, 42(3): 199-204, 2006.

Jo, M.R.: Rapid molecular identification and antibiotic resistance of *Vibrio* spp. isolated from the farmed olive flounders in Jeju island, Korea. *Master's Thesis*, Department of Marine Biotechnology, Jeju National University, Jeju, South Korea., 2006.

Jun, L.J.: Characterization of *tet* genes in fish pathogenic bacteria from Korea. *Master's Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea., 2003.

Jun, L.J.: Characterization of antibiotic resistant genes carried by fish pathogens in Korea. *Ph.D. Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea., 2010.

KAHPA, Korea Animal Health Product Association

Kim, H.J., Ryu, J.O., Lee, S.Y., Kim, E.S., Kim, H.Y.: Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiology.*, 15: 239, 2015.

- Kim, J.H., Kim, E.H.: Diversity of the Streptococcal strains isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Kor. Fish. Soc., 36(6): 654-660, 2003.
- Kim, J.H., Kim, S.G., Kim, S.S., Kim, J.H., Park, S.H., Nam, K. H., Kim, H.B.: Analysis of the antibiotic resistance gene in *Salmonella Typhimurium* isolates from diseased pigs in Gyeongbuk province. Korean Journal of Veterinary Service., 36(2): 73-78, 2013.
- Kim, M.S., Seo, J.S., Park, M.A., Cho, J.Y., Hwang, J.Y., Kwon, M.G., Jung, S.H.: Antimicrobial resistance of *Edwardsiella tarda*, *Vibrio* spp., and *Streptococcus* spp. isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 23(1): 37-45, 2010.
- Kim, M.S., Cho, J.Y., Choi, H.S.: Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. J. Fisherise Science., 80(2): 333-339, 2014.
- Kim, S.S., Jang, J.W., Song, J.W., Lim, S.J., Jeong, J.B., Lee, S.M., Kim, K.W., Son, M.H., Lee, K.J.: Effects of dietary supplementation of alga mixtures (*Hizikia fusiformis* and *Ecklonia cava*) on innate immunity and disease resistance against *Edwardsiella tarda* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Kor. J. Fish Aquat Sci., 42(6): 614-620, 2009.
- Kim, Y.H.: Characterization of tetracycline resistance genes in *Vibrio* spp. isolated from marine fishes. *Master's Thesis*, Department of Fish Pathology, Pukyong National University, Busan, South Korea., 2004.
- Lee, H.W., Lim. S.K., Kim, M.N.: Characteristics of ampicillin-resistant *Vibrio* spp. isolated from a west coastal area of Korean peninsula. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Science., 42(1): 20-25, 2009.

Levy, S.B., MuMurry L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C., Rood, J.I., Taylor, D.E.: Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial agents and Chemotherapy.*, 43(6): 1523-1524, 1999.

Mok, J.S., Song, K.C., Choi, N.J., Yang, H.S.: Antibacterial effect of Cinnamon (*Cinnamomum cassia*) Bark extract against fish pathogenic bacteria. *J. Korean Fish.*, 34(5): 545-549, 2001.

Oh, E.G., Yu, H.S., Shin, S.B., Son, K.T., Park, K.B., Kwon, J.Y., Lee, T.S., Lee, H.J.: Trimethoprim resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the fish farm. *J. Kor. Fish. Soc.*, 41(5): 324-329, 2008.

Park, Y.K., Nho, S.W., Shin, G.W., Park, S.B., Jang, H.B., Cha, I.S., Ha, M.A., Kim, Y.R., Dalvi, R.S., Kang, B.J., Jung, T.S.: Antibiotic susceptibility and resistance of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus parauberis* isolated from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Microbiology.*, 136: 76-81, 2009.

Roberts, M.C.: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews.*, 19: 1-24, 1996.

Roberts, M.C.: Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology.*, 245: 195-203, 2005.

Sakai, T., Iida, T., Osatomi, K., Kanai, K.: Detection of type 1 fimbrial genes in fish pathogenic and non-pathogenic *Edwardsiella tarda* strains by PCR. *Fish Pathology.*, 42(2): 115-117, 2007.

Son, K.T., Oh, E.G., Lee, T.S., Lee, H. J., Kim, P.H., Kim, J.H.: Antimicrobial susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* from fish farms on the southern coast of

Korea. J. Kor. Fish. Soc., 38(6): 365-371, 2005.

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J.: Biodiversity of Vibrios. Microbiology and molecular biology Reviews., 68(3): 403-431, 2004.

Woo, S.H., Kim, H.J., Lee, J.S., Kim, J.W., Park, S.I.: Pathogenicity and classification of streptococci isolated from cultured marine fishes. Journal of Fish Pathology., 19(1): 17-33, 2006.

Yang, H.Y.: Rapid molecular identification and antibiotic resistance of *Streptococcus* spp. isolated from the cultured olive flounder in Jeju. *Master's Thesis*, Department of Aquatic Life Medicine, Jeju National University, Jeju, South Korea., 2008.

Yvonne, A., Andreas, P.: The tetracycline resistance determinant *Tet* 39 and the sulphonamide resistance gene *sulII* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand. Journal of Antimicrobial Chemotherapy., 59(1): 23-27, 2006

VII . 감사의 글

2년이라는 석사과정동안 많은 분들의 도움으로 제 작은 노력이 담긴 논문이 나오게 된 것 같아 그분들께 감사의 말을 전하고자 합니다.

먼저, 언제나 자상한 가르침과 부모님같은 관심과 사랑으로 저를 이끌어주신 존경하는 정준범 교수님께 감사드립니다. 그리고 논문이 완성되기까지 항상 저의 부족한 논문에 관심을 가져주시고, 애정어린 조언으로 저를 성장시켜주신 전려진 박사님께도 감사드립니다. 또한, 학부시절부터 석사과정까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님, 최광식 교수님, 허문수 교수님, 이제희 교수님, 여인규 교수님, 전유진 교수님, 이경준 교수님, 이영돈 교수님, 김기영 교수님, 이승현 교수님, 정석근 교수님, 박상률 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

지난 석사생활동안 제게 도움을 주었던 잊혀진 떡볶이 현경언니, 세미양아치 막내가 연수, 물심양면 굼 제공자 준영오빠에게 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 그리고 그 시간들이 힘들고 지칠 때마다 언제나 힘이 되어준 친구들. 난 지도교수님이 두 명인 줄 알았어.. 잔소리전공 닭달 및 재촉 전문 나의 영원한 고유딩 고유진, 예비강릉댁 곽미림, 방탈출 매니아 강민지, 유천동지 곽혜정, 프로커팅러 가위손 박수진에게도 고마운 마음을 전합니다.

또, 저의 영원한 카리스마 방장님이자 애정하는 승민오빠도! 고맙습니다.

끝으로 한결같은 사랑과 믿음으로 저를 든든하게 지켜준 부모님께도 감사드리며 부족하지만 제 노력이 담긴 이 논문을 바칩니다.